

## МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ ЗА CCL<sub>4</sub>—ІНДУКОВАНОГО ЦИРОЗУ ТА ПЕЧІНКОВОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ НА ТЛІ ЛІКУВАННЯ

Е. Г. Манжалій, О. В. Вірченко, Т. М. Фалалєєва, О. Г. Курик

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України,  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України,  
Науково—практичний центр профілактичної та клінічної медицини Державного управління справами, м. Київ

## MORPHOLOGICAL HEPATIC CHANGES IN RATS WHILE CCL<sub>4</sub>—INDUCED CIRRHOSIS AND HEPATIC ENCEPHALOPATHY ON BACKGROUND OF TREATMENT

E. G. Manzhaliy, O. V. Virchenko, T. M. Falaleyeva, O. G. Kuryk

Bogomolets National Medical University, Kyiv,  
Kyiv National University named after Taras Shevchenko,  
Scientific—Practical Centre of Prophylactic and Clinical Medicine, Kyiv

Печінкова енцефалопатія (ПЕ) виникає більш ніж у 70% хворих при ЦП. Цей патологічний стан, незалежно від ЦП, корелює з зменшенням показників виживання, погіршенням якості життя хворих, частотою госпіталізації [1]. Трансплантація печінки є єдиним способом лікування ПЕ, що не піддається іншому лікуванню, проте, теж має свої ризики. ПЕ не є показанням до трансплантації печінки, якщо не асоціюється з порушенням її функції. В деяких ситуаціях, якщо ПЕ впливає на якість життя пацієнта та не піддається стандартному лікуванню, необхідне здійснення трансплантації печінки, незважаючи на її задовільне функціонування. Портосистемне шунтування (ПСШ) може спричинити неврологічні розлади та постійну ПЕ навіть після трансплантації печінки. Ці шунти слід виявляти та здійснювати емболізацію перед або під час трансплантації. Виразеність ПЕ після трансплантації зменшується, проте, нейродегенеративні порушення прогресують. Тому слід відрізнити ПЕ від інших когнітивних розладів, зокрема, хвороби Альцгеймера, цереброваскулярної хвороби. Пацієнт, опікуни та медики мають пам'ятати, що трансплантація печінки може спричинити порушення функції головного мозку, крім того, не всі прояви ПЕ зникають після цього втручання.

### Реферат

Вивчений вплив холіну альфосцерату на морфометричні показники печінки щурів за умови цирозу та печінкової енцефалопатії (ПЕ), спричинених введенням 15% розчину CCl<sub>4</sub> протягом 4 тиж. у порівнянні з стандартною схемою лікування. Відзначено зменшення вираженості гістологічних змін у печінці, об'єму ушкоджених гепатоцитів, стромально—паренхіматозного відношення та збільшення ядерно—цитоплазматичного відношення у щурів при цирозі печінки (ЦП) під впливом холіну альфосцерату. Індекси фіброзу та гістологічної активності за шкалою Knodell свідчили про зменшення тяжкості ураження печінки у щурів, яких лікували з використанням холіну альфосцерату.

**Ключові слова:** цироз печінки; гістологічні зміни; холіну альфосцерат; експеримент.

### Abstract

Impact of choline alfoscerate on morphological hepatic indices in rats with hepatic cirrhosis and hepatic encephalopathy, caused by injection of 15% solution of CCl<sub>4</sub> during 4 weeks, in comparison to standard scheme of treatment, was studied. Reduction of the hepatic histological changes severity, of the injured hepatocytes volume, of stromal—parenchymal ratio and enhancement of nucleocytoplasmic ratio in rats with hepatic cirrhosis under the choline alfoscerate impact were noted. The fibrosis and histological activity index in accordance to Knodell's scale witnessed a reduction of severity of hepatic affection in rats, which were treated, using choline alfoscerate.

**Keywords:** hepatic cirrhosis; histological changes; choline alfoscerate; experiment.

Складною проблемою є поява синдрому сплутаності свідомості після операції, встановити причину якої важко, оскільки він може мати різне походження. У пацієнтів за алкогольної хвороби печінки та повторної ПЕ ризик трансплантації високий. Токсичний вплив препаратів для пригнічення імунітету є стандартною причиною, що асоціюється з тремором та підвищенням рівня аміаку в крові. Інші негативні церебральні наслідки застосування лікарських засобів складно діагностувати.

Хоча ПЕ виникає під впливом багатьох чинників, ключову роль

відіграє збільшення вмісту циркулюючого аміаку. Причиною цього є, насамперед, ураження гепатоцитів, зменшення діаметра синусоїдних судин через розростання фіброзної тканини в перисинусоїдному просторі, що підвищує тиск у ворітній вені і зумовлює виникнення ПСШ [2]. Аміак проникає крізь гематоенцефалічний бар'єр і метаболізується астроцитами в глутамін, що підвищує осмотичний тиск та спричиняє набряк астроцитів. При ураженні астроцитів порушується їх взаємодія з нейронами, внаслідок чого уражуються нервові клітини [2]. Для зменшення вмісту аміаку в крові сучас-

ний підхід до лікування ПЕ передбачає застосування неабсорбуючих дисахаридів, зокрема, лактулози, та антибіотиків [2]. Проте, ці підходи недостатньо ефективні. Застосування антибіотиків обмежене через їх побічні реакції, що виникають за їх тривалого застосування. Окремі дослідники не виявили достатньої терапевтичної ефективності лактулози [3, 4]. Тому нашу увагу привернув холіну альфосцерат, що одночасно покращує передачу нервових імпульсів у холінергічних нейронах, позитивно впливає на пластичність нейрональних мембран і функцію рецепторів, покращує церебральний кровоток, активує метаболічні процеси в головному мозку та структури ретикулярної формації [5, 6].

У попередньому дослідженні встановлений зв'язок між покращенням неврологічного статусу під впливом холіну альфосцерату та нормалізацією біохімічних параметрів крові, що характеризують функціонування печінки [7]. Тобто, холіну альфосцерат не лише зменшує вираженість ПЕ при цирозі, а й частково відновлює функціонування печінки за таких патологічних умов.

Метою дослідження є оцінка впливу лікування з використанням холіну альфосцерату на морфометричні показники печінки щурів за умови експериментального моделювання ЦП і ПЕ та порівняння його з стандартною схемою лікування.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Гістологічні дослідження печінки проведені у 40 щурів—самців, розподілених на 4 групи: I — інтактні тварини; II — щури з ЦП та ПЕ без лікування ( $\text{CCl}_4$ —контроль); III — щури, яким вводили  $\text{CCl}_4$  та лікували за стандартною схемою; IV — щури, яким вводили  $\text{CCl}_4$  та лікували з застосуванням холіну альфосцерату. Експерименти проведені з дотриманням положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей, та загальних етичних прин-

ципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001).

За попередніми даними, оптимальним способом моделювання патологічних процесів у щурів є внутрішньоочеревинне введення 1 мл/кг 15% розчину вуглецю тетрахлориду ( $\text{CCl}_4$ ) в оливковій олії 4 рази на тиждень впродовж 4 тиж [8]. Після моделювання ПЕ тварин III і IV груп лікували відповідно за стандартною та новою схемою, тварин I і II груп утримували в звичайних умовах виварію. Стандартна схема лікування передбачала внутрішньошлункове введення рифаксиміну й лактулози та внутрішньоочеревинні ін'єкції ларнамину (L—орнітину—L—аспартату). Препарати вводили 1 раз на добу. Доза ларнамину становила 75 мг/кг, його вводили з розрахунку 1 мл/кг, рифаксимін вводили з розрахунку 10 мг/кг, лактулозу — в дозі 1,5 мл/кг. Дози препаратів визначали відповідно до таких у людини. Нова схема лікування включала внутрішньошлункове введення лактулози та внутрішньоочеревинне — холіну альфосцерату. Лактулозу вводили в такій самій дозі, що й за стандартної схеми лікування. Терапевтична доза холіну альфосцерату становила 15 мг/кг (у перерахунку до дози у людини 1000 мг/70 кг).

Лікування проводили впродовж 1 міс, після чого тварин виводили з експерименту, видаляли печінку. Вирізали 2 — 3 шматочки для морфологічного дослідження, які фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. Після фіксування орган вміщували у гістопроектор карусельного типу STP—120. На станції ЕС—350 препарат заливали в парафін, для отримання гістологічних зрізів використаний ротаційний мікротом НМ—340Е, зрізи фарбували за допомогою автомата Robot—Stainer HMS—740 гематоксиліном та еозинном, досліджували під мікроскопом Axioskop 40.

Гістологічні препарати досліджували з використанням світлооптичного та морфометричного методів. Визначали такі показники: діаметр гепатоцитів, діаметр їх ядер, ядер-

но—цитоплазматичне відношення, стромально—паренхіматозне відношення в досліджуваних клітинах печінки, відносний об'єм ушкоджених гепатоцитів.

Статистична обробка даних проведена в пакеті програм SPSS—20. Розподіл даних аналізували з використанням критерію нормальності Колмогорова—Смирнова. Відмінності між групами з параметричним розподілом даних проаналізовані за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням тесту Тьюккі для попарних порівнянь. Непараметричні дані порівнювали за критерієм Краскела—Уоліса для множинного порівняння з подальшим застосуванням критерію Манна—Уїтні для попарних порівнянь. Різницю між групами вважали статистично значущою при  $p$  менше 0,05. Значущі відмінності між групами на діаграмах позначали латинськими літерами a, b, c, d. Однакова літера над двома стовпчиками діаграми свідчила про відсутність відмінностей; різні літери відображали значущі відмінності між відповідними двома групами даних.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин контрольної групи відзначали нормальну гістологічну будову печінки. Тяжі гепатоцитів печінкових часточок мали чітку радіальну спрямованість. Зони печінкових триад та синусоїдні гемокapіляри нормальних розмірів. Зірчасті ретикулоендотеліоцити не змінені. Гепатоцити нормальної форми та розмірів, з рівномірно пофарбованою, оптично помірно щільною цитоплазмою, без включень. Ядра гепатоцитів нормохромні, центрально розташовані, з одним, іноді двома ядерцями. Поодинокі двоядерні гепатоцити є ознакою їх мітотичного поділу.

У тварин, яким вводили  $\text{CCl}_4$ , виявлені ознаки ЦП (рис. 1). Відзначене розростання фіброзної тканини з формуванням несправжніх часточок. Спостерігали виражену дифузну великокрапельну жирову дистрофію гепатоцитів, місцями настільки виражену й поширену, що

мала вигляд жирового гепатозу. Зони печінкових триад суттєво розширені, виявляли лейкоцитарну інфільтрацію в паренхімі печінки. Судини повнокровні з стазом еритроцитів. Наведені зміни свідчили про порушення морфофункціональної цілісності тканини печінки.

Стандартне лікування ЦП сприяло покращенню структури печінки (рис. 2). Відзначали вогнищеве розростання фіброзної тканини ворітних каналів, формування несправжніх часточок, вогнищеву велико- та середньокрапельну жирову дистрофію гепатоцитів, помірну інфільтрацію фіброзної тканини ворітних каналів лімфоцитами та макрофагами.

Проте, незважаючи на деякі порушення цілісності печінки, у препаратах тварин, яких лікували за стандартною схемою, виявляли значно меншу кількість гепатоцитів з жировою дистрофією і менш активне формування несправжніх часточок (менш виражені ознаки ЦП), ніж у нелікованих тварин.

В групі щурів, яких лікували з використанням холіну альфосцерату та лактулози, будова більшої частини паренхіми печінки відповідала фізіологічній нормі (рис. 3). Жирових включень в гепатоцитах не було. Цитоплазма гепатоцитів рівномірно пофарбована гематоксиліном та еозиним, ядра гепатоцитів округлої форми, середніх розмірів, з чітко вираженим хроматином. Виявлені невеликі ділянки зернистої дистрофії. Судини помірно повнокровні. На деяких ділянках виявлена помірна інфільтрація ворітних каналів лімфоцитами, макрофагами (рис. 4). Такі гістологічні зміни паренхіми печінки свідчили про кращий терапевтичний ефект лікування ЦП з застосуванням холіну альфосцерату, ніж стандартної схеми.

Гістологічні зміни печінки підтверджені даними морфометричного дослідження. У тварин II групи кількість пошкоджених гепатоцитів зменшилася у 15 разів ( $p < 0,001$ ). Суттєве збільшення площі клітин та зменшення площі ядер зумовлювало значне (на 44%) зменшення ядерно-цитоплазматичного відношення ( $p < 0,001$ ). Значне розростання

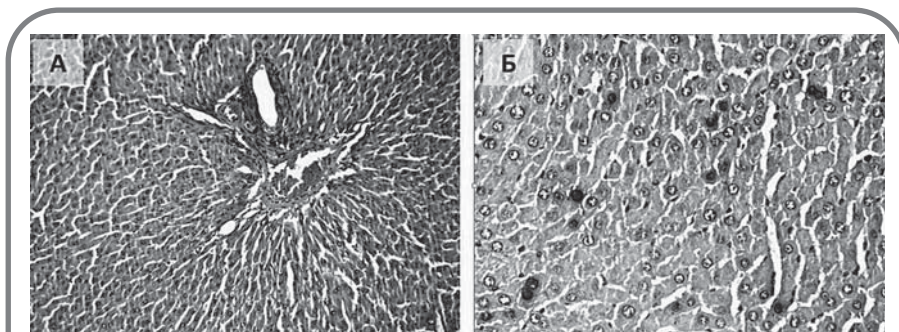


Рис. 1.

Мікрофото. Паренхіма печінки тварин I групи.

А - нормальна будова печінки: печінкова триада (артерія, вена, жовчна протока).

Забарвлення гематоксиліном та еозиним. Зб.  $\times 200$ ;

Б - чітко візуалізовані ядра гепатоцитів з ядерцями; двоядерні гепатоцити (ядра гіперхромні) як ознака мітотичного поділу клітин.

Забарвлення гематоксиліном та еозиним. Зб.  $\times 400$ .

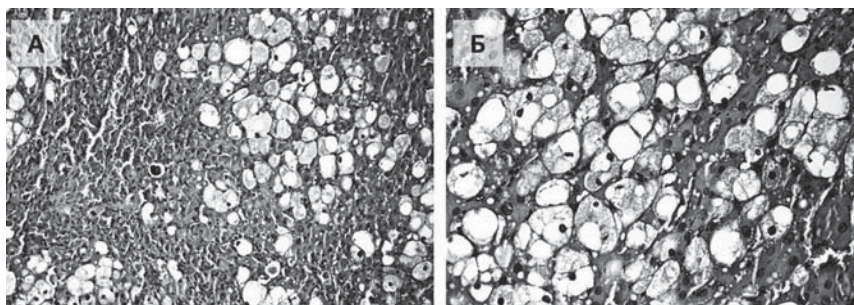


Рис. 2.

Мікрофото. Паренхіма печінки тварин II групи.

А - розростання фіброзної тканини з формуванням несправжніх часточок; дифузна великокрапельна жирова дистрофія гепатоцитів. Повнокров'я, стаз еритроцитів. Забарвлення гематоксиліном та еозиним. Зб.  $\times 200$ ;

Б - дифузна великокрапельна жирова дистрофія гепатоцитів.

Забарвлення гематоксиліном та еозиним. Зб.  $\times 400$ .

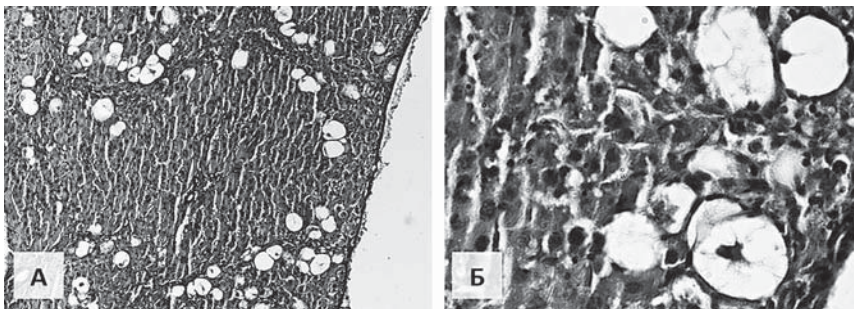


Рис. 3.

Мікрофото. Паренхіма печінки тварин III групи.

А - розростання фіброзної тканини ворітних каналів з формуванням несправжніх часточок; вогнищева велико- та середньокрапельна жирова дистрофія гепатоцитів. Забарвлення гематоксиліном та еозиним. Зб.  $\times 200$ ;

Б - вогнищева жирова дистрофія гепатоцитів.

Забарвлення гематоксиліном та еозиним. Зб.  $\times 400$ .

строми навколо печінкових часточок, а також між трабекулами проявлялося збільшенням стромально-паренхіматозного відношення на 58% ( $p < 0,05$ ). Розростання сполучної тканини в стромі свідчило про формування фіброзу печінки, що є

однією з ознак ЦП — заміщення печінкових часточок волокнистою сполучною тканиною з утворенням циротичних вузлів. За стандартного лікування та застосування холіну альфосцерату об'єм пошкоджених гепатоцитів зменшувався відповідно

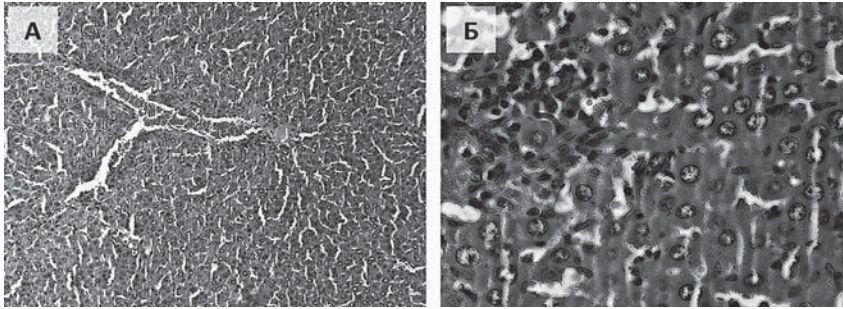


Рис. 4.

Мікрофото. Паренхіма печінки тварин IV групи.  
 А - нормальна гістологічна будова печінки, помірне повнокров'я.  
 Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.  $\times 200$ ;  
 Б - вогнищева помірна інфільтрація лімфоцитами, макрофагами; зерниста  
 дистрофія гепатоцитів.  
 Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.  $\times 400$ .

у 3,2 разу ( $p < 0,05$ ) та 5,8 разу ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з таким у нелікованих тварин. Виявлене суттєве зменшення стромально—паренхіматозного відношення в печінці та збільшення ядерно—цитоплазматичного відношення в гепатоцитах. Під впливом ларнаміну та рифаксиміну ядерно—цитоплазматичне відношення збільшувалося на 43% ( $p < 0,05$ ), стромально—паренхіматозне — зменшувалося на 26% ( $p < 0,05$ ). Відповідно, ці показники у тварин IV

при цьому найбільш значний позитивний ефект лікування досягнутий після введення холіну альфосцерату.

Більш точна діагностика стадії ЦП та формування фіброзу встановлена на основі аналізу показників за шкалою Knodell (див. таблицю). У тварин II групи показник фіброзу свідчив про формування ЦП — в окремих щурів, порто—портального та порто—центрального мостоподібного фіброзу — у інших, в той час як після лікування у більшості тва-

0,05), що відповідало стадії слабо вираженої та мінімальної активності гепатиту.

Величина наведених індексів підтверджує позитивний вплив лікування на стан печінки та свідчить про дещо кращий терапевтичний ефект холіну альфосцерату на некрозапальні зміни в печінці, хоча вплив на формування фіброзу не відрізнявся від такого стандартного лікування.

Отже, при застосуванні холіну альфосцерату — високоефективного препарату, що впливав на когнітивну дисфункцію при ЦП, відзначали відновлення тканини печінки, ушкодженої токсичною дією  $CCl_4$ , що узгоджувалося з покращенням біохімічних показників функціонування печінки, встановленим у попередніх дослідженнях. Це свідчить про вплив нейропротектора на морфологічні зміни тканини печінки при експериментальному ЦП.

## ВИСНОВКИ

1. Суттєві зміни гістологічних та морфометричних показників тканини печінки у щурів після введення  $CCl_4$  підтверджують ефективність моделювання ЦП.

### Показники ушкодження печінки за шкалою Knodell

| Показник, балів  | Величина показника в групах щурів ( $\bar{x} \pm m$ ) |                             |                            |                            |
|--|---|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|  | I   | II                          | III                        | IV                         |
| Стадія фіброзу   | 0,0 $\pm$ 0,0   | 3,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>  | 1,4 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup> | 1,2 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup> |
| Перипортальний та мостоподібний некроз гепатоцитів               | 0,0 $\pm$ 0,0   | 5,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>  | 2,2 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup> | 1,3 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup> |
| Внутрішньочасточкова дегенерація та фокальний некроз гепатоцитів | 0,0 $\pm$ 0,0   | 3,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>  | 1,1 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup> | 0,8 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup> |
| Запалення ворітних каналів                                       | 0,0 $\pm$ 0,0   | 3,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>  | 1,3 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup> | 0,6 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup> |
| Загальний індекс гістологічної активності                        | 0,0 $\pm$ 0,0   | 13,2 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup> | 4,6 $\pm$ 0,9 <sup>d</sup> | 2,7 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup> |

Примітка. Однакова літера над значеннями у двох групах свідчить про відсутність відмінностей ( $p < 0,05$ ).

групи становили 67 та 30% ( $p < 0,05$ ). При цьому при застосуванні обох схем лікування співвідношення строми та паренхіми відновлювалося до такого в інтактних тварин, а ядерно—цитоплазматичне відношення не відрізнялося від такого в інтактних тварин лише після введення холіну альфосцерату. Наведені дані свідчили про суттєве покращення стану печінки при використанні терапевтичних заходів,

рин виявлений лише фіброз ворітних каналів. Загальний індекс гістологічної активності за Knodell, що характеризує ступінь некрозапальної активності в печінці, свідчив про виражену активність гепатиту за наявності мостоподібного некрозу (найбільш тяжкої форми) у щурів, яким вводили  $CCl_4$ . Після стандартного лікування та застосування холіну альфосцерату цей індекс зменшувався відповідно у 2,9 та 4,9 разу ( $p <$

2. При застосуванні холіну альфосцерату вираженість гістологічних змін зменшувалася, зменшувалися об'єм пошкоджених клітин, вираженість фіброзу та некрозапальних явищ в тканині печінки, активізувалися процеси репаративної регенерації, що підтверджує ефективність запропонованої нової схеми лікування ЦП.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Tapper E. B. Rifaximin for the prevention of readmissions for patients with hepatic encephalopathy — the price is right / E. B. Tapper // *Liver International*. — 2016. — Vol. 36, N 9. — P. 1252 — 1254.
2. Suraweera D. Evaluation and management of hepatic encephalopathy: current status and future directions / D. Suraweera, V. Sundaram, S. Saab // *Gut, Liver*. — 2016. — Vol. 10, N 4. — P. 509 — 519.
3. Als—Nielsen B. Non—absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials / B. Als—Nielsen, L. L. Gluud, C. Gluud // *Br. Med. J.* — 2004. — Vol. 328, N 7447. — P. 1046.
4. Effect of lactitol and lactulose administration on the fecal flora in cirrhotic patients / O. Riggio, M. Varriale, G. P. Testore [et al.] // *J. Clin. Gastroenterol.* — 1990. — Vol. 12, N 4. — P. 433 — 436.
5. Шкурко М. Г. Эффективность и переносимость глиятилина в лечении печеночной энцефалопатии / М. Г. Шкурко, Э. Г. Манжалій // *Укр. неврол. журн.* — 2013. — № 1. — С. 91 — 95.
6. Cholinergic precursors in the treatment of cognitive impairment of vascular origin: ineffective approaches or need for re—evaluation? / L. Parnetti, F. Mignini, D. Tomassoni [et al.] // *J. Neurol. Sci.* — 2007. — Vol. 257, N 1 — 2. — P. 264 — 269.
7. Манжалій Е. Г. Чи є зв'язок між нейропротектором холіну альфосцератом та біохімічними показниками за умов експериментального цирозу печінки? / Е. Г. Манжалій, О. В. Вірченко // *Вісн. пробл. біології і медицини*. — 2016. — Т. 2, № 1. — С. 65 — 69.
8. Покращення моделювання та діагностики печінкової енцефалопатії у щурів / Е. Г. Манжалій, Т. М. Кондратюк, В. Є. Фалалеева [та ін.] // *Там же*. — 2016. — Т. 126, № 1. — С. 239 — 243.

